

Diagnostyka i sytuacja epidemiologiczna brucelozy bydła w Polsce

KRZYSZTOF SZULOWSKI, WOJCIECH IWANIAK, MARCIN WEINER,
JOLANTA ŻŁOTNICKA, MONIKA SZYMAJDA, ZOFIA ZARĘBA, HANNA CZĘPIŃSKA

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Szulowski K., Iwaniak W., Weiner M., Żłotnicka J., Szymajda M., Zaręba Z., Czępińska H.
Diagnosis and epidemiological condition of bovine brucellosis in Poland

Summary

The surveys of cattle for brucellosis in Poland are primarily based on serological tests. The examinations are performed by regional laboratories using RBT. In the case of positive results obtained in this test the samples are examined in SAT and CFT. The definitive confirmatory investigations are conducted by the National Reference Laboratory for Brucellosis in the Department of Microbiology of NVRI in Puławy, which additionally uses Coombs' test, 2-Me test and ELISA. In the paper the results of the examination of cattle in Poland in the years 2005-2010 are shown. Each year during this period 1.1-1.3 million animals were included in the surveys and 130-317 cows were involved in confirmatory investigations. 12-34 animals were classified as positive for brucellosis. In bacteriological examinations of samples from seropositive cows, *Brucella abortus* was never once isolated. Since 2009 Poland is officially a brucellosis free country.

Keywords: brucellosis, diagnosis, cattle

Bruceloza jest groźną zoonozą o dużym znaczeniu ekonomicznym i epidemiologicznym, znaną w świecie pod różnymi nazwami: ronienie zakaźne, choroba Banga, gorączka maltańska, gorączka śródziemnomorska, gorączka gibraltarska, gorączka fałująca, a w odniesieniu do *Brucella ovis* zakaźne zapalenie najądrzy u tryków. Wywołują ją bakterie rodzaju *Brucella*, w obrębie którego wyróżnia się 6 podstawowych gatunków mających wśród zwierząt swoich głównych żywicieli: *B. abortus* (bydło), *B. melitensis* (kozy, owce), *B. suis* (świnie), *B. canis* (psy), *B. ovis* (owce) i *B. neotomae* (szczur pustynny). W ostatnich latach wyodrębniono również kolejne gatunki: *B. ceti* i *B. pinnipedialis* (ssaki morskie), *B. microti* (gryzonie) i *B. inopinata* (implant piersi) (6, 14, 15). Zmiany chorobowe u zwierząt dotyczą głównie narządów rozrodczych, prowadząc do ronienia i niepłodności. Często dochodzi do zatrzymania łożyska i zapalenia macicy. U krów czasami infekcja dotyczy tylko węzłów chłonnych nadwymieniowych i/lub wymienia, co prowadzi do stałego wydalania bruceli z mlekiem. U samców objawem brucelozy jest najczęściej zapalenie jąder i najądrzy. Typowe dla brucelozy są również zapalenia stawów, najczęściej stawów kończyn. Brucele, szczególnie *B. suis*, cechuje też osteotropizm, przez co proces chorobowy umiejscawia się w kościach, a następnie w stawach kończyn i kręgosłupa, prowadząc do kulawizny, porażenia i obrzęków. W wie-

lu przypadkach bruceloza ma charakter bezobjawowy. Obecności zarazka w narządach rodnych i wymieniu, przy równoczesnym wydalaniu bruceli z mlekiem, nie zawsze towarzyszą widoczne objawy kliniczne. Źródłem zakażenia mogą być: płód lub noworodek, łożysko, wody płodowe, śluz, ropa, wydaliny (kał, mocz), nasienie, mleko, krew, jak również woda w wodopojach, kałużach, sadzawkach, gleba, wybiegi, pastwiska.

Materiał i metody

Diagnostyka brucelozy, ze względu na skalę badań, opiera się przede wszystkim na badaniach serologicznych. Polegają one na stwierdzeniu obecności specyficznych przeciwciał w organizmie zwierzęcia, indukowanych przez drobnoustroje *Brucella*. Testy, które powinny być używane w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej poszczególnych krajów, określają: Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) w Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (3) i Unia Europejska (UE) w Aneksie C do Dyrektywy 64/432/EWG (5). Manual OIE jako testy zalecane do stosowania w diagnostyce brucelozy bydła (prescribed tests) wymienia: zbuforowane testy z antygenem brucelozowym (BBAT), których odmianą jest stosowany w Polsce odczyn kwaśnej aglutynacji płytowej (OKAP), odczyn wiązania dopełniacza (OWD), ELISA i odczyn fluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPA) (3, 21). UE z kolei wymienia testy stosowane w diagnostyce brucelozy bydła i określa standardy, które powinny być w odniesieniu do nich

spełnione. Te testy to: BBAT, odczyn aglutynacji probówkowej (OA), OWD, ELISA z surowicą. Dodatkowo dopuszcza się stosowanie testów z mlekiem, którymi mogą być próba pierścieniowa lub ELISA.

W Polsce, w odniesieniu do bydła, znajdują również zastosowanie, na poziomie Krajowego Laboratorium Referencyjnego Brucelozy (KLRB), odczyn antyglobulinowy Coombsa (OAG) i odczyn z 2-merkaptetanolem (OME) (13, 18).

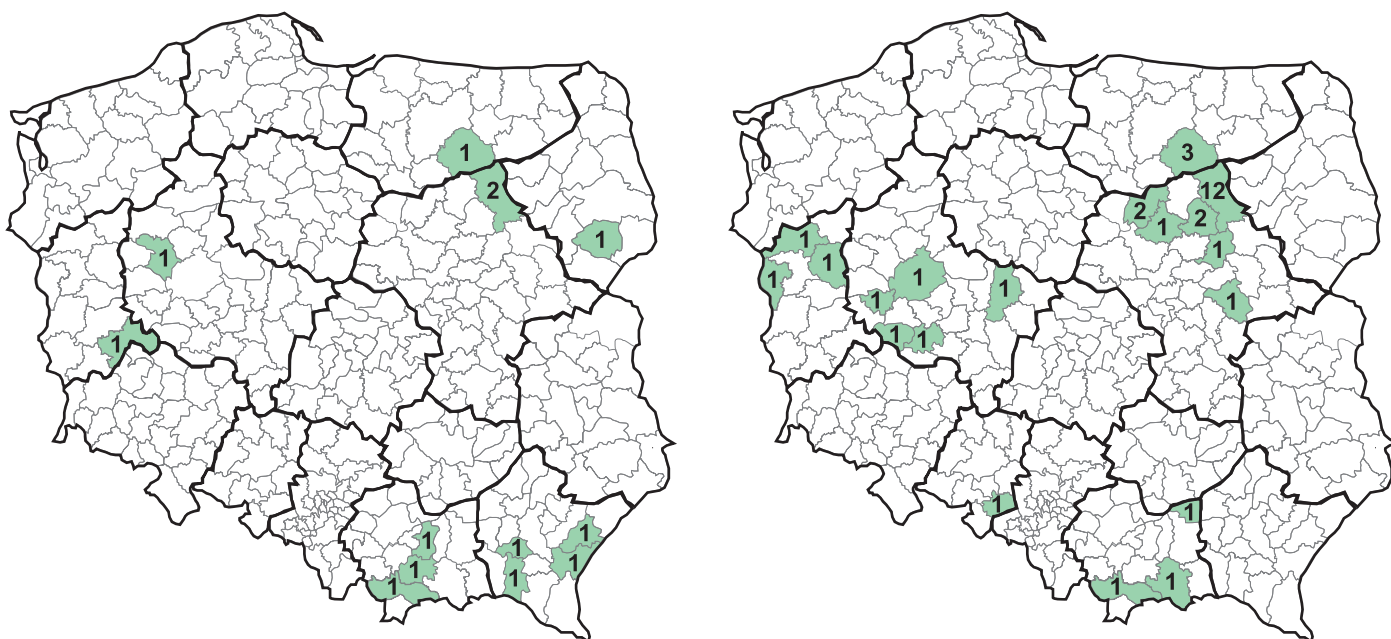
Materiał od zwierząt, których surowice reagowały dodatnio w badaniach serologicznych, podany zostaje każdorazowo w KLRB badaniu bakteriologicznemu w kierunku izolacji i identyfikacji drobnoustrojów *Brucella*. Posiewów materiału dokonuje się na pożywce stałej – agarze z glukozą i surowicą oraz dodatkiem selektywnym (SDA+SS) i pożywce płynnej – bulionie z glukozą i surowicą oraz dodatkiem selektywnym (SDB+SS). Identyfikacji bruceli dokonuje się poprzez wykonanie szeregu testów: aglutynacji szkiełkowej z surowicą anti-*Brucella*, aglutynacji szkiełkowej z surowicami monowalentnymi anti-A i anti-M, z akryflawiną, na katalazę, na zapotrzebowanie CO₂ do wzrostu, na ureazę, na siarkowodór, na wzrost *Brucella* w obecności barwników fuksyny zasadowej i tioniny, testu bakteriolizy przez bakteriofagi, a także wykonanie barwienia metodą Grama i metodą Ziehl-Neelsena. KLRB dysponuje także nowoczesnymi narzędziami diagnostyki molekularnej, jak: testami PCR (BCSP 31, Bruce-Ladder, AMOS) i metodą VNTR (variable number tandem repeat) (16, 19, 20).

Badania bakteriologiczne wykonują również laboratoria Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW) w odniesieniu do poronionych płodów, stosując do tego celu pożywki, których przydatność jest sprawdzana w KLRB. Według obowiązującej Instrukcji GLW, izolaty podejrzane o przynależność do rodzaju *Brucella* powinny zostać dostarczone do KLRB (9).

Tab. 1. Wyniki badań bydła w Polsce w kierunku brucelozy w latach 2005-2010

Rok	Całkowita liczba zwierząt	Liczba zwierząt zbadanych	Liczba zwierząt poddanych badaniu potwierdzającemu	Liczba zwierząt reagujących pozytywnie	Odsetek zwierząt reagujących
2005	6 146 623	1 152 058	220	12	0,0010
2006	6 107 410	1 294 547	172	24	0,0018
2007	5 908 557	1 265 276	149	12	0,0009
2008	6 080 517	1 162 700	130	25	0,0022
2009	6 169 652	1 252 809	202	13	0,0010
2010	6 185 211	1 197 384	317	34	0,0028

Model badania w Polsce. Badania bydła w kierunku brucelozy odbywają się zgodnie z ustalonym algorytmem (8). Do niedawna obejmowały 1/3 pogłowia i dotyczyły bydła powyżej 1 roku życia. Od 2010 r., w związku z uzyskaniem w 2009 r. przez Polskę statusu kraju urzędowo wolnego od brucelozy bydła (4), badanych jest co najmniej 20% stad; badania obejmują zwierzęta powyżej 24 miesięcy. Dodatkowo badane są buhaje w stacjach unasienniania i punktach kopulacyjnych oraz zwierzęta importowane do naszego kraju i eksportowane za granicę. Badania skriningowe przy użyciu OKAP wykonywane są przez laboratoria ZHW. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego laboratoria te wykonują badania przy użyciu OA i OWD. W każdym przypadku uzyskania wyniku dodatniego w OWD (20 lub więcej międzynarodowych jednostek przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml – mjpwd/ml) zbadaną surowicę należy przesać do KLR celem wykonania badania potwierdzającego. Natomiast jeśli surowica dodatnia w OKAP reaguje dodatnio tylko w OA (więcej niż 30 międzynarodowych jednostek aglutynacyjnych w 1 ml – mj/ml), badanie potwierdzające wykonuje ZHW, a do badania należy pobrać krew po 30 dniach od poprzedniego pobrania. Badanie to wykonuje się również metodami OA i OWD. Każdy wynik dodatni w OA i/lub w OWD wymaga potwierdzenia przez KLRB, które bada surowicę tymi



Ryc. 1. Lokalizacja i liczba wyników dodatnich w badaniu serologicznym w kierunku brucelozy w Polsce w 2009 r. (z lewej) i 2010 r. (z prawej)

samymi metodami (OA i OWD) oraz dodatkowo przy użyciu OME, OAG i ELISA.

Każdy wynik wątpliwy w OWD (10-20 mjpgw/ml) jest wskazaniem do powtórnego badania surowicy uzyskanej z krwi pobranej po 30 dniach od pobrania poprzedniego.

Surowicę uznaje się za reagującą dodatnio, jeśli KLRB potwierdzi wyniki dodatnie uzyskane w OWD i/lub uzyska wyniki dodatnie w badaniach dodatkowych jedną z trzech stosowanych metod. W przypadku dodatniego wyniku uzyskanego w badaniach serologicznych istnieje konieczność uboju zwierzęcia i wykonania badań hodowlanych.

Wyniki i omówienie

W latach 2005-2010 odnotowano od 130 do 317 próbek surowic, które skierowano do KLRB w celu wykonania badań potwierdzających (tab. 1). Były to więc surowice dodatnie w OKAP, OA i OWD lub też z ujemnym wynikiem w OWD, ale długo utrzymującym się dodatnim wynikiem w OA (potwierdzonym dwukrotnym badaniem zwierzęcia w odstępie 30-dniowym). Ostatecznie, po wykonaniu badania potwierdzającego przez KLR liczbą zwierząt z dodatnim wynikiem badania serologicznego w kierunku brucelozы kształtowała się w tym okresie na poziomie 12-34 sztuk. Odsetek zwierząt reagujących dodatnio w latach 2006-2010 wynosił 0,0009-0,0028, a więc był na bardzo niskim poziomie. Jak przedstawiono na ryc. 1, w ostatnich 2 latach dodatnie wyniki badania serologicznego stwierdzano w następujących województwach: podkarpackim (4 przypadki), małopolskim (3 przypadki), mazowieckim (2 przypadki), wielkopolskim, lubuskim, warmińsko-mazurskim i podlaskim (po 1 przypadku) – w 2009 r. i mazowieckim (19 przypadków), wielkopolskim (5 przypadków), lubuskim, małopolskim, warmińsko-mazurskim (po 3 przypadki) i opolskim (1 przypadek) w 2010 r. Należy dodać, że w badaniu bakteriologicznym materiału od bydła reagującego dodatnio w badaniu serologicznym w tym okresie ani razu nie izolowano *B. abortus*. W jednym przypadku, w 2006 r., izolowano natomiast z materiału pałeczki *B. suis* biotyp 2. Podobnie, w badaniu poronionych płodów nie izolowano tych drobnoustrojów.

W tab. 2 przedstawiono szczegółowe wyniki badań surowic od bydła zakwalifikowanych jako dodatnie w kierunku brucelozы w 2010 r. Spośród 34 surowic zdecydowana większość, bo 29, reagowała dodatnio w OWD w mianie 20-268 mjpgw/ml. W przypadku 5 surowic stwierdzono obecność przeciwciał w OWD na pozo-

Tab. 2. Szczegółowe wyniki badań surowic bydła zakwalifikowanych jako dodatnie w kierunku brucelozы w 2010 r.

Lp.	OKAP	OA (mj/ml)*	OWD (mjpgw/ml)**	OME (miano)	OAG (stopnie przewyższenia)	ELISA
1.	+	36	16,8	1/10	4 ⁰	+
2.	+	72	67	3/40	4 ⁰	+
3.	+	36	33,5	3/10	4 ⁰	+
4.	+	143,5	46,5	-	1 ⁰	-
5.	+	51,5	40	1/10	3 ⁰	+
6.	+	72	20	-	2 ⁰	-
7.	+	41	33,5	1/10	3 ⁰	+
8.	+	143,5	93	2/40	3 ⁰	+
9.	+	20,5	16,8	-	4 ⁰	+
10.	+	72	20	-	2 ⁰	-
11.	+	102,5	40	-	1 ⁰	-
12.	+	41	80	2/20	4 ⁰	+
13.	+	36	20	-	2 ⁰	-
14.	+	31	13,3	-	3 ⁰	+
15.	+	36	23,3	-	4 ⁰	+
16.	+	72	80	4/20	4 ⁰	+
17.	+	36	20	2/10	3 ⁰	-
18.	+	143,5	33,5	-	2 ⁰	-
19.	+	123	20	-	1 ⁰	-
20.	-	20,5	8,4	2/10	5 ⁰	+
21.	+	25,5	46,5	-	4 ⁰	+
22.	+	51,5	11,6	3/10	3 ⁰	-
23.	+	51,5	11,6	-	3 ⁰	-
24.	+	61,5	20	-	2 ⁰	-
25.	+	20,5	46,5	3/10	4 ⁰	+
26.	+	410,5	46,5	-	-	-
27.	+	36	67	3/20	4 ⁰	+
28.	+	246	33,5	-	-	-
29.	+	246	20	-	1 ⁰	-
30.	+	18	20	1/20	2 ⁰	-
31.	+	143,5	33,5	-	1 ⁰	-
32.	+	143,5	23,3	-	1 ⁰	-
33.	+	821	268	1/40	-	-
34.	+	123	23,3	-	-	-

Objaśnienia: * – międzynarodowe jednostki aglutynacyjne w 1 ml; za dodatni uważa się wynik co najmniej 30 mj/ml; ** – międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz w 1 ml; za dodatni uważa się wynik co najmniej 20 mjpgw/ml

mie niższym niż 20 mjpgw/ml w OWD, a oceniono je ostatecznie jako dodatnie na podstawie pozytywnej reakcji w OAG, OME lub ELISA, co wynika z zapisów Instrukcji Głównego Lekarza Weterynarii w sprawie postępowania przy podejrzeniu, potwierdzeniu i zwalczaniu oraz przy prowadzeniu badań kontrolnych bru-

celozy (9). Zwykle wyniki dodatnie dotyczyły pojedynczych seroreagentów w stadzie, ale zdarzyły się również przypadki, kiedy w danym stadzie stwierdzono 2-5 wyników zakwalifikowanych ostatecznie jako dodatnie.

Model badania oparty o prowadzenie badań monitoringowych bydła w kierunku brucelozy i eliminację pozytywnych seroreagentów jest typowy dla krajów o podobnej sytuacji epidemiologicznej jak Polska. Funkcjonuje on przy pełnej świadomości faktu, że dodatnia reakcja w badaniu serologicznym, nawet przy użyciu metod uważanych za najbardziej specyficzne, nie jest dowodem zakażenia zwierzęcia pałeczkami *Brucella*. Takim dowodem jest dopiero izolacja i identyfikacja drobnoustroju z materiału pobranego od podejrzanego o zakażenie zwierzęcia. Z drugiej strony, należy mieć świadomość niskiej czułości metod hodowlanych i możliwości braku izolacji drobnoustroju przy istniejącym stanie zakażenia. W warunkach naszego kraju od dawna nie izolowano od bydła *B. abortus*, natomiast, jak wspomniano, stwierdzono przypadek izolacji *B. suis* biotyp 2. Bydło może ulec zakażeniu tym drobnoustrojem, który nie wywołuje u niego żadnych objawów, indukuje natomiast powstawanie przeciwciał anti-*Brucella* identycznych jak w przypadku zakażeń każdym gatunkiem *Brucella* występującym w przyrodzie w formie gładkiej (12). Zakażenie tym drobnoustrojem może być przyczyną przynajmniej części dodatnich reakcji serologicznych u bydła w Polsce. Prowadzone dotychczas badania wskazują bowiem, że naturalnym rezerwuarem tego zarazka są w Polsce zwierzęta wolno żyjące – zajęce i dziki (17). Poprzez skażone pastwiska, wybiegi, wodopoje może dochodzić do przenoszenia zarazka ze zwierząt dzikich na bydło. Można również przypuszczać, że u części zwierząt, nawet przy kontakcie z zarazkiem, nie dochodzi do zakażenia organizmu, ale do stymulacji antygenem bruceli wywołującej przeciwciała anti-*Brucella*, czego skutkiem jest dodatni wynik badania serologicznego. Należy mieć również na względzie, że część reakcji dodatnich ma charakter niespecyficzny i jest wynikiem bądź reakcji nieswoistych związanych ze stanem fizjologicznym zwierzęcia (obecność tzw. naturalnych przeciwciał), bądź reakcji krzyżowych będących wynikiem obecności w organizmie zwierzęcia drobnoustrojów o budowie pokrewnej z brucelami, np. *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella Urbana*, *Pseudomonas maltophilia* (1-3, 7, 11). Największe znaczenie ma ten pierwszy gatunek, charakteryzujący się posiadaniem w swojej strukturze antygeny lipopolisacharydowego (LPS) nie do odróżnienia od antygeny brucelozowego i indukującego przez to niemal identyczną odpowiedź serologiczną. Z tego względu od niedawna Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii w sprawie postępowania przy podejrzeniu, potwierdzeniu i zwalczaniu oraz przy prowadzeniu badań kontrolnych brucelozy (8) nakazuje w przypadku bydła reagującego dodatnio w badaniach serologicznych wykonanie przez ZHW badania kału na obecność *Yersinia*. Ponadto

w KLRB podjęto badania nad opracowaniem specyficznej i czulej metody opartej na biologii molekularnej, pozwalającej na różnicowanie zakażeń pałeczkami *Brucella* i *Y. enterocolitica*. W prowadzonych przez KLRB badaniach 17 próbek kału od krów poddanych ubojowi po dodatnim wyniku badania serologicznego w kierunku brucelozy, w 7 przypadkach izolowano *Y. enterocolitica* O:9. Potwierdza to przypuszczenia, że część reakcji dodatnich w kierunku brucelozy u bydła może być powodowana przez obecność w organizmach krów tych drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. Alton G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M.: Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA, Paris 1988.
2. Anon.: Joint FAO/WHO Export Comm. Brucellosis, Sixth Report, WHO, Geneva 1986.
3. Anon.: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, Paris 2008.
4. Decyzja Komisji z dnia 5 sierpnia 2009 r. zmieniająca decyzję 2003/467/WE w odniesieniu do uznania niektórych państw członkowskich i ich regionów za oficjalnie wolne od brucelozy bydła (2009/600/WE).
5. Decyzja Komisji z dnia 10 grudnia 2008 r. zmieniająca załącznik C do dyrektywy Rady 64/432/EWG oraz decyzję 2004/226/WE w odniesieniu do testów diagnostycznych na obecność brucelozy bydła (2008/984/WE).
6. Foster G., MacMillan A. P., Godfroid J., Howie F., Ross H. M., Cloeckaert A., Reid R. J., Brew S., Patterson I. A.: A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 2002, 90, 563-580.
7. Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R., Very P., Cau C., Berr V., Dufour B., Moutou F.: False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Vet. Res.* 1997, 28, 375-383.
8. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii Nr GIWz. 401/BB-16/2010 z dnia 30 listopada 2010 r. w sprawie postępowania przy podejrzeniu, potwierdzeniu i zwalczaniu oraz przy prowadzeniu badań kontrolnych brucelozy.
9. Instrukcja nr 46/2003 Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 25 sierpnia 2003 r. Nr GIWzVII.420/lab – 23/2003 dotycząca przeprowadzenia badania bakteriologicznego w kierunku brucelozy bydła.
10. Johnson R. P., Boag L., Anderson S., Holtslander R., Rahn K., Clarke R. C., Renwick S. A., Alves D., Wilson J. B., Spika J.: *Brucella abortus* serology in cattle naturally infected with *Escherichia coli* O 157:H7. *Vet. Rec.* 1994, 135, 382-383.
11. Nielsen K., Smith P., Widdison J., Gall D., Kelly L., Kelly W., Nicoletti P.: Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.* 2004, 100, 25-30.
12. Norton J. H., Thomas A. D.: *Brucella suis* infection in pregnant cattle. *Aust. Vet. J.* 1979, 55, 525-527.
13. Pilaszek J., Szulowski K., Iwaniak W.: Sytuacja epidemiologiczna brucelozy zwierząt w Polsce. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 363-366.
14. Scholz H. C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S.: *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008, 58, 375-382.
15. Scholz H. C., Nöckler K., Göllner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Kämpfer P., Cloeckaert A., Maquart M., Zygmunt M. S., Whatmore A. M., Pfeffer M., Huber B., Busse H. J., De B. K.: *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, 60, 801-808.
16. Szulowski K., Murat J.: Nowoczesne aspekty diagnostyki molekularnej brucelozy. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 741-744.
17. Szulowski K., Pilaszek J.: Zwierzęta wolno żyjące jako rezerwuary drobnoustrojów *Brucella*. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 687-690.
18. Szulowski K., Pilaszek J., Truszczyński M.: Ocena testu ELISA w porównaniu do metod konwencjonalnych w rozpoznawaniu brucelozy bydła. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 607-610.
19. Weiner M., Iwaniak W., Szulowski K.: Comparison of PCR-based AMOS, Bruce-Ladder and MLVA assays for typing of *Brucella* species. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2011, 55, 625-630.
20. Weiner M., Iwaniak W., Szulowski K.: Identification of *Brucella* DNA in lymph tissue from deer (*Cervus elaphus*) and wild boars (*Sus scrofa*) by the use of BCSP31 PCR and AMOS-PCR. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 609-612.
21. Weiner M., Iwaniak W., Zlotnicka J., Szulowski K.: Diagnosis of bovine brucellosis using serological techniques and fluorescence polarization assay. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 489-493.

Adres autora: dr hab. Krzysztof Szulowski, prof. nadzw., Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kszjanow@piwet.pulawy.pl